



日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

#12

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application:

1998年10月 2日

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第296138号

[ST.10/C]:

[JP1998-296138]

出願人
Applicant(s):

株式会社ワイエスニューテクノロジー研究所

RECEIVED

APR 26 2002

TECH CENTER 1600/2900

RECEIVED

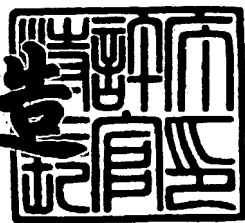
APR 25 2002

TC 1700

2002年 3月29日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2002-3021958

【書類名】 特許願

【整理番号】 SNMFP98378

【提出日】 平成10年10月 2日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【国際特許分類】 C12N 5/10

【発明の名称】 樹立細胞

【請求項の数】 5

【発明者】

 【住所又は居所】 宮城県仙台市太白区三神峰1丁目3番地3-501号

 【氏名】 細谷 健一

【発明者】

 【住所又は居所】 宮城県仙台市泉区明石南2-1-5

 【氏名】 寺崎 哲也

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県川越市今福1672-1-719

 【氏名】 上田 正次

【発明者】

 【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区八幡5-3-10-402

 【氏名】 帯刀 益夫

【特許出願人】

 【識別番号】 395007255

 【氏名又は名称】 株式会社ワイエスニューテクノロジー研究所

【代理人】

 【識別番号】 100090941

 【氏名又は名称】 藤野 清也

 【電話番号】 3226-6671

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 014834

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【物件名】	受託証	1

【書類名】 明細書
 【発明の名称】 樹立細胞
 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 網膜毛細血管内皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞。

【請求項 2】 FERM BP-6507である、請求項 1 記載の樹立細胞。

【請求項 3】 SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の網膜毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られた細胞を継代培養して不死化細胞を得ることを特徴とする、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体及びp-糖蛋白質を発現する不死化細胞の樹立方法。

【請求項 4】 トランスジェニック動物としてラットを用いる、請求項 3 記載の不死化細胞の樹立方法。

【請求項 5】 SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の網膜毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養して得られる、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、網膜毛細血管内皮細胞由来の樹立細胞に関する。

本発明により得られる樹立細胞は、シャーレー上で培養すると表裏極性を持つ網膜毛細血管内皮細胞の単一層が得られるため、網膜毛細血管内皮細胞への薬物の取り込み試験により網膜への薬物透過の予測、網膜実質における各種因子や栄養物質の供給と代謝に関する研究、網膜毛細血管内皮細胞に存在する選択的物質透過の輸送機構研究、網膜毛細血管内皮細胞に対する薬物の毒性研究などに用いることができる。又、グリア細胞の一種のミュラ細胞との共培養により、血液網膜関門を試験管内で再構築することができる。従って、本発明の細胞株は、医薬品の安全性あるいは有効性に関するスクリーニング、眼内の恒常性維持、網膜組織の機能障害に関連する疾患の診断及びその治療方法の開発を細胞レベルで研

究するのに有用である。

【0002】

【従来の技術】

従来、医薬品の安全性や有効性を精査する試験は、主に動物を用いて行なわれていた。しかし、動物愛護の観点から大量の動物を使用することを避け、培養細胞等を用いて試験管内で医薬品の有効性や安全性を試験する技術の実用レベルでの活用が開始されている。例えば、生体組織から採取した初代細胞や無限増殖する樹立培養細胞を用いる方法で予め試験した後に動物試験を行なうことがなされている。しかし、初代細胞は初期段階ではよく増殖するが、継代とともに次第に増殖が停止し、やがては死滅する（この現象を細胞老化と呼ぶ）。更に、初代細胞の特性は、生体組織から採取する度に異なる危惧に加え、その細胞特性も継代とともに変化することが指摘されている。特に、増殖速度が非常に遅い場合や微小器官に由来する場合には、試験に供するに足る初代細胞を得ることは非常に難しい。一方、初代細胞の継代を重ねるなかで、細胞老化を免れて無限増殖する能力を獲得した樹立細胞では、安定して均一の特性を持つが、この様な細胞の多くは、その細胞が生体において本来有していた形態や機能の一部或いはその全てを喪失するため、この様な細胞株を用いた場合には、その細胞株の由来する組織での本来の特性を正確に反映することは難しかった。そこで、初代細胞にras やc-mycなどの発癌遺伝子、アデノウイルスの E1A遺伝子、SV40ウイルスのラージT抗原遺伝子、ヒトパピローマウイルスの HPV16遺伝子等を導入して細胞を形質転換し、初代細胞の有する活発な増殖能を継続的に保持し、しかも継代することによってもその細胞固有の特性を喪失しない不死化細胞を樹立する試みがなされている。ところが、この様な不死化細胞においても、対象とする臓器によっては、その初代細胞を調製し、これらの癌遺伝子やラージT抗原遺伝子を導入する時点で、すでに幾つかの機能を喪失するため、本来の機能を保持する厳密な意味での不死化細胞の取得は困難であった。特に、増殖速度が非常に遅い場合や微小器官に由来する場合の初代細胞を調製して株化することは極めて困難であった。

【0003】

これに対し、近年確立された動物個体への遺伝子導入技術を用いて、個々の細

胞に癌遺伝子やラージT抗原遺伝子を導入するかわりに、これらの遺伝子を安定的に染色体に組み込んだ遺伝子導入動物を作出して、個体の発生時点において既に癌遺伝子やラージT抗原遺伝子を細胞の中に保有する動物の臓器から初代細胞を調製して、これを継代することにより不死化細胞を樹立する方法が報告されている。特に、SV40の温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックマウスは、その臓器から不死化細胞を容易に得ることができ、得られた細胞の増殖や分化形質の発現は、温度を変えることによって操作することができるため非常に有効である (Noble M. et al. (1995) Transgenic Research 4, 215-225 ; Obinata M. (1997) Genes to Cells 2, 235-244)。マウスに比べ体重が約10倍あるラットは、各種臓器からの細胞株の樹立に供する細胞を調製する上で、特に、網膜毛細血管内皮細胞のような微小器官に由来する細胞を株化する場合には、器官を分離して初代細胞を容易に得ることができるため有利である。そこで、各種臓器から不死化細胞を容易に得ることができ、得られた細胞の増殖や分化形質の発現が温度を変えることによって操作可能である不死化細胞の樹立に有効なSV40の温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラットを既に作出した。

【0004】

一方、血液眼関門の研究において、動物愛護の観点から動物試験に替わる網膜毛細血管内皮の初代細胞を用いる方法が試みられるようになってきている。この場合に、試験に供するに足る細胞を小型の実験動物から得ることが難しいため、ウシ等の大型の家畜の眼球を使用しなければならない。例えば、20個のウシの眼球から網膜毛細血管内皮細胞を単離して2回の継代培養を行なっても約 9×10^6 個の細胞しか得られず (Wong H.C. et al. (1987) Invest. Ophthalmol. Visual Sci., 28, 1767-1775)、医薬品のスクリーニングには大量のウシの眼球が必要であった。このため、これに替わる有効な網膜毛細血管内皮細胞株の提供が切望されていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、このような状況に鑑み鋭意研究の結果、不死化遺伝子を導入し

たトランスジェニックラットの網膜組織から網膜毛細血管を分離し、得られた毛細血管から網膜毛細血管内皮細胞を分離することにより、不死化細胞を樹立するに至った。従って本発明は、網膜毛細血管内皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞を得ることを課題とする。

また、本発明は、SV40温度感受性突然変異株tsA58のラージT抗原遺伝子を用いて不死化細胞の樹立方法を提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明は、網膜毛細血管内皮細胞由来の樹立細胞に関する。詳しくは、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞に関する。このような樹立細胞としては、工業技術院生命工学工業技術院研究所、特許微生物寄託センターに受託番号 FERM BP-6507 として寄託された細胞株を挙げることができる。

また、本発明は、SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の網膜組織をホモゲナイズして毛細血管を分離し、得られた網膜毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養することによって不死化細胞を樹立する方法に関する。

さらに、本発明は、このような樹立方法で樹立された細胞に関する。

本発明により得られる樹立細胞は、シャーレー上で培養すると表裏極性を持つ網膜毛細血管内皮細胞の単一層が得られるため、網膜毛細血管内皮細胞への薬物の取り込み試験により網膜への薬物透過の予測、網膜実質における各種因子や栄養物質の供給及び代謝に関する研究、網膜毛細血管内皮細胞に存在する選択的物質透過の輸送機構研究、網膜毛細血管内皮細胞に対する薬物の毒性研究などに用いることができる。また、グリア細胞の一種のミュラ細胞との共培養により、血液網膜関門を試験管内で再構築することができる。従って、本発明の細胞株は、医薬品の安全性あるいは有効性に関するスクリーニング、眼内の恒常性維持、網膜組織の機能障害に関連する疾患の診断及びその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用である。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明で使用するSV40の温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラットは、以下のように得ることができる。即ち、SV40の温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を、例えば、SV40の複製起点(ori)を欠失させたtsA58ori(-)-2株の全ゲノムDNAを制限酵素 BamHIで開環して pBR322 に導入したプラスミド pSVtsA58ori(-)-2 (Ohno T. et al., Cytotechnology 7, 165-172 (1991)) を常法に従い大腸菌内で大量に増幅させる。このようにして調製したプラスミドを制限酵素 BamHIで切断してベクター部位を除去する。この様にして得られたtsA58 のラージT抗原遺伝子を持つDNA(5,240bp)には、ラージT抗原遺伝子のプロモーターが内在するため、このDNAを導入したラットにおいては、その全ての体細胞においてこの遺伝子(tsA58のラージT抗原遺伝子)が発現することになる。

【0008】

次に、この様にして得られたDNAを常法に従いラットの全能性細胞に導入して温度感受性ラージT抗原遺伝子を全ての細胞内に有する遺伝子導入ラットを作出する。全能性細胞としては、受精卵や初期胚のほか多分化能を有するES細胞があげられる。この様な卵子や培養細胞へのDNA導入法はマイクロインジェクション法、電気パルス法、リボソーム法、リン酸カルシウム法等が利用できる。

更に、所望する本遺伝子を導入した培養細胞の核を除核未受精卵に移植して初期化すること(核移植)で卵子に本遺伝子を導入することができる。しかし、遺伝子導入ラットを得る効率からは、現在のところ前核期受精卵の雄性前核に本遺伝子をマイクロインジェクションして得られる卵子を仮親の卵管に移植して産仔を得た後、注入遺伝子を持つ産仔を選出し、安定的に本遺伝子が組み込まれた個体を得ることで、個体発生時にすでにtsA58 のラージT抗原遺伝子が各組織の細胞の染色体に組み込まれた遺伝子導入ラットを効率よく作出することができる。

【0009】

次に、この様にして作出した遺伝子導入ラットの各臓器から常法に従い細胞(初代細胞)を取り出して継代培養を繰り返すことで不死化細胞を調製することが

できる。得られた細胞は33～37℃において永久的増殖能を持ち、39℃においては増殖を停止するため細胞固有の分化形質の発現を制御することができるという特色を持つ。このラットの眼球より網膜を摘出して細切し、テーパー型テフロン製ホモゲナイザーで組織を磨り潰して得られたスラリーを遠心してペレットを得る。得られたペレットを酵素（プロテアーゼ）溶液に懸濁して振とうを加えながら酵素処理を行い、毛細血管を不要な組織から分離させた後、遠心してペレットを得る。得られたペレットから不要な組織を除去するため、25%ウシ血清アルブミンを含むハンクス平衡塩液（HBSS）に懸濁し、遠心により毛細血管ペレットを回収する。得られたペレットを再び酵素溶液に懸濁して酵素処理を行うことで毛細血管を細切した後、培養シャーレーに播種する。2回の継代の後、コロニー形成を行い、増殖速度の比較的速いコロニーをペニシリンカップを用いて周囲の細胞から単離し、この操作を2回繰り返して行うことにより、本発明の細胞を単離することができる。単離された細胞は、tsA58 のラージT抗原、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質の発現をウエスタンブロッティング法で検定することにより、不死化網膜毛細血管内皮細胞と同定することができる。得られた細胞は、50回の継代の後も33℃において良好な増殖性を示し、網膜毛細血管内皮細胞としての機能を保持した細胞である。

【0010】

【実施例】

以下の実施例をもって本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示したのみであり、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

【0011】

【実施例1】

トランスジェニックラットの作出

SV40の温度感受性突然変異株 tsA58のDNAを導入したトランスジェニックラットは、下記の手順で作出した。

①導入遺伝子の調製

マイクロインジェクションにはSV40の温度感受性突然変異株 tsA58のDNAを使用した。このDNAは tsA58のゲノムDNAを制限酵素 BamHIで開環し、pBR3

22の BamHI部位に導入し、Sfi I 配列をSacII に変換してSV40の複製起点(ori)を欠失する ri(-) としてのDNAクローンpSVtsA58ori(-)-2 (Ohno T. et al., Cytotechnology 7, 165-172 (1991) Fig.1参照) から常法に従い調製した。即ち、大腸菌内で増幅させて得たプラスミドDNAのpSVtsA58ori(-)-2を制限酵素 BamHI (宝酒造社製) で消化した後、アガロースゲル電気泳動 (1% gel; ベーリンガー社製) を行いてベクター部分を分離した5240bpのtsA58 のDNA (直鎖状 DNA断片) をゲルから切り出した。アガラーゼ処理 (0.6 unit/100mgゲル: Agarase; ベーリンガー社製) によりゲルを溶解した後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿処理を行いDNAを回収した。回収した精製DNAをTEバッファー (1mM EDTAを含む10mM Tris-HCl, pH 7.6) に溶解して 170 μ g/mLの精製DNA溶液を得た。このDNA溶液を注入用バッファー (0.1mM EDTAを含む 10mM Tris-HCl, pH 7.6) で 5 μ g/mLとなるように希釈して注入用DNA溶液を調製した。尚、調製したDNA溶液は注入操作まで -20℃で保存した。

【0012】

②トランスジェニックラットの作出

ラット前核期受精卵への上記①で調製した注入用DNA溶液のマイクロインジェクションは下記の要領で行った。性成熟した8週齢のウイスター (Wistar) ラットを明暗サイクル12時間 (4:00~16:00 を明時間)、温度23±2℃、湿度55±5%で飼育し、膣スメアにより雌の性周期を観察して、ホルモン処理日を選択した。先ず、雌ラットに150IU/kgの妊馬血清性腺刺激ホルモン〔日本ゼンヤク: PMS全薬 (pregnant mare serum gonadotropin; PMSG)〕を腹腔内投与し、その48時間後に75IU/kg のヒト絨毛性性腺刺激ホルモン〔三共臓器: プベローゲン (human chorionic gonadotropin; hCG)〕を投与して過剰排卵処理を行った後、雄との同居により交配を行った。hCG 投与32時間後に卵管灌流により前核期受精卵を採取した。卵管灌流および卵の培養にはmKRB液 (Toyoda Y. and Chang M.C., J. Reprod. Fertil., 36, 9-22 (1974))を使用した。採取した受精卵を 0.1% ヒアルロニダーゼ (シグマ社製: Hyaluronidase TypeI-S)を含むmKRB液中で37℃、5分間の酵素処理を行い卵丘細胞を除去した後、mKRB液で3回洗浄して酵素を除去し、DNA注入操作までCO₂-インキュベーター内 (5% CO₂-95% Air, 37

℃、飽和湿度)に保存した。この様にして準備したラット受精卵の雄性前核にDNA溶液を注入した。注入操作した228個の卵を9匹の仮親に移植して出産させ80匹の産仔を得た。注入DNAのラットへの導入は、離乳直後に断尾して得た尾より調製したDNAをPCR法により検定〔使用プライマー; tsA58-1A, 5'-TCCTAATGTGCAGTCAGGTG-3' (1365~1384部位に相当), tsA58-1B, 5'-ATGACGAGCTTTGGCACTTG-3' (1571~1590部位に相当)〕した。その結果、遺伝子の導入を認めた20匹(雄6匹、雌8匹、性別不明6匹)の産仔を得た。これらの中から性成熟期間を経過する12週齢まで生存した11ラインのトランスジェニックラット(雄ライン: #07-2, #07-5, #09-6, #12-3, #19-5, 雌ライン: #09-7, #11-6, #12-5, #12-7, #18-5, #19-8)を得た。これらのG₀世代のトランスジェニックラットとウィスターラットを交配し、雄ファウンダーの2ライン(#07-2, #07-5)と雌ファウンダーの3ライン(#09-7, #11-6, #19-8)において次世代以降への遺伝子の伝達を確認した。

【0013】

【実施例2】

トランスジェニックラットからの網膜毛細血管内皮細胞の分離

網膜からの網膜毛細血管内皮細胞の分離はGreenwoodの方法(Greenwood J. (1992) J. Neuroimmun., 39, 123-132)を改良して行なった。実施例1で得られたSV40の温度感受性突然変異株tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラット(1匹)より眼球を摘出した。クリーンベンチ内で氷冷した調製用緩衝液(10 mM Hepes, 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μ /mL streptomycin sulfate, 0.5%ウシ血清アルブミンを含むHBSS)で摘出した眼球をよく洗浄した後、網膜組織を切り取り、組織を1~2 mm³に細切した。細切した組織を1 mL用テーパー型テフロンホモゲナイザー(WHEATON 社製)に移し、1 mLの氷冷した調製用緩衝液を加え、4回のアップダウンのストロークを行い組織をホモゲナイズしてスラリーを得た。得られたスラリーを遠心(600g, 5分間, 4℃)してペレットを得た。得られたペレットを1 mLの酵素溶液(0.01% collagenase/dispase (B ehringer Mannh im社製), 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μ /mL streptomycin sulfate, 20 U/mL deoxyribonuclease I, 0.147 μ /m

L t syl-lysine-chloromethylketone を添加したHBSS) に懸濁し、振とうを加えた水浴中で酵素処理 (37℃, 30分間) を行い、不要な組織から毛細血管を分離した。遠心 (600g, 5分間, 4℃) してペレットを得た。

【0014】

得られたペレットから不要な組織を除去するため、10mLの25%ウシ血清アルブミンを含むHBSSにペレットを懸濁し、遠心 (1,000g, 15分間, 4℃) により毛細血管画分のペレットを得た。得られたペレットを再び1mLの酵素溶液に懸濁して酵素処理 (37℃, 30分間) を行うことで毛細血管を細切した。遠心 (600g, 5分間, 4℃) してペレットを得た。次に、得られたペレットを2mLの培養液 (15 μ g/mL endothelial cell growth factor, 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μ /mL streptomycin sulfate, 2.50 μ /mL amphotericin Bを添加した DME M) に分散して1枚の collagen type Iをコートした35mm ϕ 培養シャーレー (Becton Dickinson社製) に種播した。33℃の炭酸ガス培養器 (5% CO₂-95% Air, 飽和湿度) 内で培養 (初代培養) した。培地を1週間に2回交換し、継代はトリプシン液 (0.05% Trypsin, 0.53 mM EDTA; Gibco BRL 社製) を用いておよそ1週間隔で行った。2回の継代の後、10² ~ 10³ 個の細胞を collagen type Iをコートした 100mm ϕ 培養シャーレー (Becton Dickinson社製) に種播した。33℃の炭酸ガス培養器内で培養してコロニー形成を行った。培地を1週間に2回交換し、7~10日後にコロニーを形成した増殖速度の比較的速いコロニーをペニシリンカップを用いて周囲の細胞から単離し、得られた細胞を再び 100mm ϕ 培養シャーレーに播種して33℃の炭酸ガス培養器内で培養してコロニー形成を行った。ペニシリンカップを用いて増殖速度の比較的速いコロニーを周囲の細胞から単離して5種の細胞株 (TR-iBRB2, TR-iBRB4, TR-iBRB6, TR-iBRB8, TR-iBRB9) を得た。

このTR-iBRB2株を工業技術院生命工学工業技術院研究所、特許微生物寄託センターに寄託した。受託番号は FERM BP-6507 である。

【0015】

【実施例3】

ラージT抗原タンパク質の確認

実施例2で得られた5種の細胞株におけるラージT抗原蛋白質の発現をウエス

タンブロット法（実験医学別冊バイオマニュアルUPシリーズ「分子生物学的アプローチによる癌研究プロトコール」 108～115 頁，羊土社，1995年発行）により検討した。5種の細胞株（継代数：20）を90mmφ培養シャーレーで飽和まで培養した。回収した細胞を3%SDS-PBS(pH7.4)で可溶化した後、遠心（10,000 rpm，10分間）して不溶画分を除去した後、フラッドフォード法（BIO-RAD 社製プロテインアッセイキットIIを使用）で総蛋白質量を定量した。それぞれ20μgの蛋白質をSDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後、ニトロセルロース膜に転写した。3%スキムミルク溶液でブロッキングしたニトロセルロース膜に1次抗体として抗SV40ラージT抗原マウス抗体（CALBIOCHEM社製，DP02-C）を、2次抗体としてHRP 標識抗マウスIgG 抗体（Amersham社製）を反応させ、ラージT抗原蛋白質特異的な反応をアマシャム社製 ECLウエスタンブローティング検出システム（RPN2106M1）を用いて検出した。結果を表1に示す。表中+はラージT抗原蛋白質に特異的な反応を検出できたことを示す。この結果、5種の細胞株全てにおいてラージT抗原蛋白質の発現を確認した。

【0016】

【表1】

細胞株	TR-iBRB2	TR-iBRB4	TR-iBRB6	TR-iBRB8	TR-iBRB9
T 抗原	+	+	+	+	+

【0017】

【実施例4】

細胞株の同定

実施例2で得られた細胞株が網膜毛細血管内皮細胞であることを、GLUT-1輸送担体及びp-糖蛋白質の発現をウエスタンブローティング法で検定することにより同定した。まず、GLUT-1輸送担体の発現をウエスタンブローティング法で検定した。得られた各細胞株について、実施例3と同じ方法で作製したニトロセルロース膜を用いて、1次抗体として抗GLUT-1マウス抗体（Chemicon社製，Temecular，C

A)又は抗p-糖蛋白質ウサギ抗体(抗mdr抗体、Oncogene Research Products社製)を、2次抗体としてHRP標識抗マウスIgG抗体(Amersham社製)又はHRP標識抗ウサギIgE抗体(Cappel社製)を反応させ、GLUT-1蛋白質あるいはp-糖蛋白質特異的な反応をアマシャム社製ECLウエスタンブローディング検出システム(RPN2106M1)を用いて検出した。結果を表2に示す。表中+は、GLUT-1蛋白質又はp-糖蛋白質の発現が確認されたことを示す。この結果、5種の細胞株全てにおいてGLUT-1蛋白質及びp-糖蛋白質の発現が確認された。従って、得られた5種の細胞株が網膜毛細血管内皮細胞であることが同定された。

【0018】

【表2】

細胞株	TR-iBRB2	TR-iBRB4	TR-iBRB6	TR-iBRB8	TR-iBRB9
GLUT-1	+	+	+	+	+
p-糖蛋白質	+	+	+	+	+

【0019】

【実施例5】

グルコース輸送能の確認

実施例2で得られた細胞株TR-iBRB2を使用し、3-OMG(3-o-methyl-D-glucose)取り込み能を測定し、濃度依存的なグルコース輸送能を示すことで機能的なGLUT-1輸送担体を有することを確認した。即ち、24穴細胞培養用プレートにTR-iBRB株を 3×10^5 /ウェル/mLとなるように播き、33℃の炭酸ガス培養器で24時間培養して細胞をコンフルエントにした。3-OMGの取り込みの測定は次の要領で行なった。まず、培地を吸引して除去した後、37℃に温めた232kBq/mLの $[^3\text{H}]$ 3-OMGを含むuptake bufferを0.2mL加えた。尚、本実施例において用いたuptake bufferはグルコースを含まないものであり、122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl_2 , 1.4 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4mM K_2HPO_4 , 10 mM Hepes, 25 mM NaHCO_3 の溶液を5% CO_2 -95% O_2 で20分間バブリングしてNaOHでpH7.4に調整されたもの(以下u

uptake buffer①とする)である。10秒後に uptake buffer①を取り除き、4℃の uptake buffer①で洗浄した。以下、 uptake buffer①を取り除くまでの時間を20秒間、30秒間、1分間として同様の操作を行なった。細胞を1%トライトン X-100を含む1mLのPBSで一晩可溶化し、液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性を測定し、3-OMGの取り込み能の直線性を確認した。結果、20秒間の取り込み時間を設定した。

【0020】

次に、3-OMGの取り込みの基質濃度依存性を検討した。細胞を37℃に温めた uptake buffer ①で洗浄した後、37℃に温めた462kBq/ ウェルの $[^3\text{H}]$ 3-OMGを含む uptake buffer ①を0.2mL加えた。ただし、非標識体の3-OMGを0,0.5,1,5,10,20,30,50mM含む uptake buffer①を使用して3-OMGの各濃度液とした。20秒後に uptake buffer ①を取り除き、4℃の10mM非標識体3-OMGを含む uptake buffer ①で洗浄した。次に、1%トライトンX-100を含む1mLのPBSで一晩可溶化し、液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性を測定した。結果を図1に示す。尚、3-OMGの濃度に対する取り込み速度のプロット式 ($V = V_{\text{max}} \times [S] / (K_m + [S])$); V_{max} は最大速度定数、 K_m はミカエリス定数、 $[S]$ は基質濃度)を用いて3-OMGの取り込みの K_m と V_{max} を非線形最少二乗法プログラム(Yamaoka K. et al. (1981) J. Pharmacobio-Dyn., 4, 879-885)を用いて解析した。この結果、GLUT-1の基質である $[^3\text{H}]$ 3-OMGの取り込みは濃度依存的であり、そのミカエリス定数(K_m)は5.6mM、最大取り込み速度定数(V_{max})は45 nmol/min/mg proteinであった。従って、本発明の細胞株は、濃度依存的にグルコース輸送能を示すことが確認された。

【0021】

【実施例6】

p-糖蛋白質の輸送能

実施例2で得られた細胞株TR-iBRB2が機能的なp-糖蛋白質輸送担体を持つことをp-糖蛋白質の基質である cyclosporin A (CyA)の取り込み測定を行い、p-糖蛋白質阻害剤である verapamil共存下での取り込みと比較することで検定した。24穴細胞培養用プレートに細胞株TR-iBRB2を 1×10^5 /ウェル/mL培地で播種し

、33℃の炭酸ガス培養器内で48時間培養して細胞をコンフルエントにした。CyAの取り込み測定は以下の要領で行なった。まず、培地を吸引して除去した後、予め37℃に温めたグルコースを含む uptake buffer (122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl_2 , 1.4 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4 mM K_2HPO_4 , 10 mM Hepes, 25 mM NaHCO_3 , 10 mM D-glucoseの溶液を5% CO_2 -95% O_2 で20分間バブリングして、NaOHでpH7.4に調整; 以下 uptake buffer ②とする) で細胞を洗浄した。次に、37℃に温めた 0.25% DMSO を含む uptake buffer②を 0.2mL加え30分間ブレインキュベーションした後に uptake buffer②を除去し、37℃に温めた37kBq/mLの ^3H CyA と 0.075 μM の非標識CyA 及び 0.25% DMSO を含む uptake buffer②を 0.2mL加えた。Verapamil 共存下での取り込みは37℃に温めた 100 μM verapamil, 0.25% DMSO を含む uptake buffer②を 0.2mL加え30分間ブレインキュベーションした後に uptake buffer②を除去し、37℃に温めた37kBq/mLの ^3H CyA と 0.075 μM の非標識CyA, 100 μM verapamil及び 0.25% DMSO を含む uptake bufferを 0.2 mL加えた。いずれの取り込み反応も30分間行なった。反応液を除去後、4℃の uptake buffer②で3回洗浄した後に1mLの1N-NaOHを加えて一晩可溶化し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。その結果 p-糖蛋白質の基質である ^3H CyA の細胞/培地の取り込み比は270 $\mu\text{L}/\text{mg protein}$ であるのに対し、p-糖蛋白質の阻害剤である 100 μM のVerapamil 共存下で ^3H CyA の細胞/培地の取り込み比は 490 $\mu\text{L}/\text{mg}$ となり、約 1.8倍の有意な取り込みの増加が見られた。また、他の細胞株でも同様の結果が得られた。

【0022】

【実施例7】

スカベンジャーレセプターの機能確認

実施例2で得られた細胞株TR-iBRB2が機能的なスカベンジャーレセプターを持つことを、蛍光標識体である 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate標識アセチル化LDL (DiI-Ac-LDL, Biomedical Technologies, Stoughton, MA)の取り込みを測定することで解析した。カバーガラスに細胞株TR-iBRB2を 1×10^5 /ウェル/mL培地で播種し、33℃の炭酸ガス培養器内で48時間培養して細胞をコンフルエントにした。DiI-Ac-LDLの取り込み測定は以下の

要領で行なった。まず、培地を吸引して除去した後に予め37℃に温めた uptake buffer②で細胞を洗浄した。次に、37℃に温めた 10 μ g/200 μ L の Dil-Ac-LDL を含む uptake buffer②を 0.2 mL 加え30分間炭酸ガス培養器でインキュベーションした。4時間後に uptake buffer②を除去し、4℃の uptake buffer②で3回洗浄した。次に、3% formaldehyde/PBS を加え20分間室温に保持して固定したものを共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内に取り込まれた蛍光を測定した。その結果、スカベンジャーレセプターのリガンドである 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate で標識されたアセチル化 LDL (Dil-Ac-LDL) が細胞内に取り込まれていることを確認した。また、他の細胞株でも同様の結果が得られた。

【0023】

【発明の効果】

本発明により、網膜毛細血管内皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞が提供される。また、SV40温度感受性突然変異株tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトラスジェニック動物の網膜組織をホモゲナイズして毛細血管を分離し、得られた網膜毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養することによって不死化細胞の樹立方法が提供される。

本発明により得られる樹立細胞は、シャーレー上で培養すると表裏極性を持つ網膜毛細血管内皮細胞の単一層が得られるため、網膜毛細血管内皮細胞への薬物の取り込み試験により網膜への薬物透過の予測、網膜実質における各種因子や栄養物質の供給と代謝に関する研究、網膜毛細血管内皮細胞に存在する選択的物質透過の輸送機構研究、網膜毛細血管内皮細胞に対する薬物の毒性研究などに用いることができる。また、グリア細胞の一種のミューラ細胞との共培養により、血液網膜関門を試験管内で再構築することができる。従って、本発明の細胞株は、医薬品の安全性あるいは有効性に関するスクリーニング、眼内の恒常性維持や網膜組織の機能障害に関連する疾患の診断あるいはその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用である。

【図面の簡単な説明】

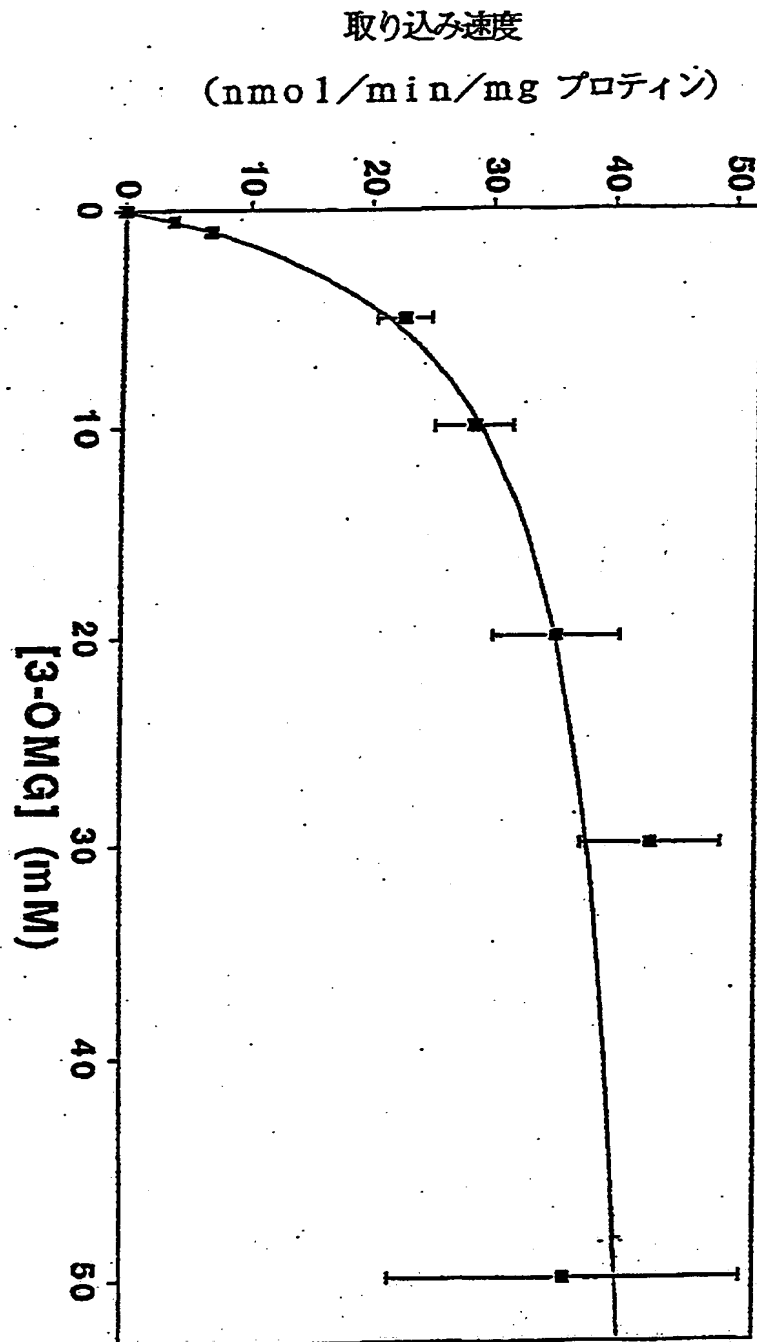
【図 1】

実施例 5 の 3-OMG の取り込み速度の基質濃度依存性を示す。

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 樹立細胞の提供。

【解決手段】 網膜毛細血管内皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞。

SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトラスジェニック動物の網膜組織をホモゲナイズして分離した網膜毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養して不死化細胞を樹立する方法。

【効果】 医薬品の安全性あるいは有効性に関するスクリーニング、眼内の恒常性維持及び網膜組織の機能障害に関連する疾患の診断あるいはその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用。

【選択図】 なし



国際様式 INTERNATIONAL FORM

〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブタベスト条約〕

下記国際寄託当局によって規則 7.1 に従い
発行される。

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

氏名 (名称) 株式会社 ワイエスニューテクノロジー研究
所 取締役研究所長 上田 正次 殿
寄託者 あて名 〒 329-0512
栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花林 5
19 番地

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) TR-15RB2	(受託番号) FERM BP- 6507
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 種の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 10 年 9 月 18 日 (原寄託日) に受領した 1 種の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に 1 種の微生物を受領した。 そして、 年 月 日 に原寄託よりブタベスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
<p>通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所</p> <p>名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency for Industrial Science and Technology</p> <p>所長 大箸 信 Dr. Shinobu Oshiki Director-General</p> <p>あて名: 日本国茨城県つくば市 1-3, Higashi 1-chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN (郵便番号 305-8566)</p> <p>平成 10 年 (1998) 9 月 18 日</p>	

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 395007255
【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花林519番地
【氏名又は名称】 株式会社ワイエスニューテクノロジー研究所
【代理人】 申請人
【識別番号】 100090941
【住所又は居所】 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階
藤野特許事務所
【氏名又は名称】 藤野 清也
【提出された物件の記事】
【提出物件名】 原寄託についての受託証 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [395007255]

1. 変更年月日 1995年 3月31日
[変更理由] 新規登録
住 所 栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花林519番地
氏 名 株式会社ワイエスニューテクノロジー研究所